

“PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO.”

5 A presente invenção diz respeito a um processo de produção de isomaltulose, a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se células de *Erwinia sp* D12 imobilizadas em alginato de sódio. A produção de açúcares alternativos a partir de sacarose tem grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica.

10 A isomaltulose (6-O-alfa-D-glicopiranosil-D-frutofuranose) é um dissacarídeo redutor, também conhecido como palatinose, possuindo cerca de 37-42 % da doçura e propriedades físicas e organolépticas muito similares às da sacarose. Devido ao baixo potencial cariogênico, a isomaltulose é utilizada comercialmente na produção de doces e gomas de mascar. A isomaltulose é também usada na produção de isomalte [alfa-D-glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + alfa-D-glicopiranosil 1, 6 sorbitol (GPS)], (Patent Specification N°1483998
15 (1977) e United States Patent N°4233439, 1980). O isomalte apresenta um poder adoçante de cerca de 45-60 % ao da sacarose em solução aquosa a 20°C. É altamente resistente ao aquecimento, modificações químicas e enzimáticas. Possui ponto de fusão na faixa de 145-150°C, sendo que sua densidade e viscosidade são similares às da sacarose. Em comparação com outros açúcares
20 álcoois, tais como manitol, sorbitol e xilitol, o isomalte tem uma tendência maior para cristalização e menor higroscopicidade. É adequado para diabéticos por ser apenas parcialmente hidrolisado e absorvido no intestino delgado. Devido a sua baixa higroscopicidade, o isomalte é especialmente utilizado em formulações farmacêuticas, facilitando a liberação do princípio ativo, por dissolver mais facilmente em composições contendo, fenilpropanolamina, benzocaína e isomalte na proporção de 75% p/p (European Patent-A1-431376, Haarmann & Reimer).

30 A isomaltulose apresenta também um grande interesse industrial na formação de polímeros e surfactantes, atuando como intermediário na síntese de blocos construtivos destas moléculas (Carbohydrates as Organic Raw materials (FW Lichtenthaler, ed) pp 127-154, VCH Weinheim, New York, 1991). A isomaltulose pode ser transformada em 3-ceto-isomaltulose através da oxidação microbiana, realizada por *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB 396
35 (*Biotechnology and Bioengineering*, v.48, p.12-16, 1995). Soluções alcalinas de isomaltulose e ácidos carboxílicos insaturados formam copolímeros, que podem ser usados em detergentes (DE-A1-3834237, Grillo-WerKe AG). A isomaltulose pode ser aminada para isomaltamina, que pode ser acilada com ácidos carboxílicos insaturados e polimerizada para aminopoliol-N-acryl-polímeros, um produto altamente estável a degradação microbiana (European Patent-A2-255033, Sudzucker AG). A isomaltulose pode também ser convertida a 5-(alfa-D-glicopiranosiloximetil)-furan-2-carboxaldeído por tratamento com coluna de troca iônica fortemente ácida em alta temperatura. Este derivado pode ser usado como tensoativo (DE-A1-3936522, Sudzucker AG). Tratando-se a isomaltulose
40 em pH ácido à quente, obtêm-se um produto de condensação, que pode ser usado como agente estimulante da proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal (DE-A1-3818884 (Mitsui Sugar Co).

A isomaltulose é um açúcar alternativo, obtido através da conversão enzimática da sacarose pela enzima glicosiltransferase. O primeiro registro desta

enzima foi do microrganismo *Protaminobacter rubrum*, o qual foi isolado por Weidenhagen e Lorenz e identificado por Windish em 1958 (German Patentschrift N°1049800).

5 A isomaltulose juntamente com a leucrose foi identificada como subprodutos da síntese de dextrana a partir de sacarose, utilizando-se preparações enzimáticas de *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512F) (*The Journal of Organic Chemistry*, v.25, p.1062-1063,1960).

10 Linhagens de *Protaminobacter rubrum* (European Patent Specification N°0001099, 1979 e United States Patent N°4640894, 1987), de *Erwinia rhapontici* (UK Patent Application GB N°2063268 A, 1981 e United States Patent N°4670387, 1987), de *Klebsiella terrigena* JCM 1687 e *Klebsiella* sp número 88 (European Patent Application N°0392556 A1, 1990) e *Serratia plymuthica* (European Patent Specification N°0001099,1979), têm sido descritas na literatura para a conversão de sacarose em isomaltulose.

15 A Patente N°P.22.17628.9 (1974) da República Federativa do Brasil descreve que a conversão da sacarose em isomaltulose pode ser realizada de forma contínua ou em batelada, utilizando-se massa celular de *Protaminobacter rubrum* ou de *Serratia plymuthica* e soluções de sacarose 15 a 40%, com forte agitação e aeração entre 20 e 37°C.

20 O processo acima citado apresenta algumas desvantagens: (a) O crescimento e a multiplicação das células, oxida parte da sacarose adicionada, diminuindo assim o substrato para a formação de isomaltulose.

25 (b) A conversão de sacarose para isomaltulose e a simultânea multiplicação das células requer fermentação com agitação intensa e aeração, ocasionando um alto consumo de energia.

30 (c) A multiplicação das células requer além da fonte de carbono, fonte de nitrogênio e sais nutrientes, os quais são fornecidos no referido trabalho através de soluções de açúcares de baixa pureza. Estas impurezas (não açúcares) podem causar perda de isomaltulose durante a cristalização.

As desvantagens acima citadas podem ser evitadas em processos que possibilite separar a conversão de sacarose em isomaltulose da multiplicação celular.

35 O presente processo torna possível a obtenção de isomaltulose, a partir de reações enzimáticas, utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas e sacarose como substrato, evitando assim as desvantagens acima citadas. Para a otimização da produção da enzima glicosiltransferase, utilizou-se o melaço como fonte energética para o cultivo de *Erwinia* sp D12, sendo o mesmo um sub-produto da obtenção de açúcar e álcool nas usinas, tornando o processo economicamente viável, principalmente no Brasil, onde a produção de sacarose é grande. Abaixo é mostrado um exemplo de produção, purificação e cristalização de isomaltulose.

Exemplo:

O processo proposto, consiste das seguintes etapas:

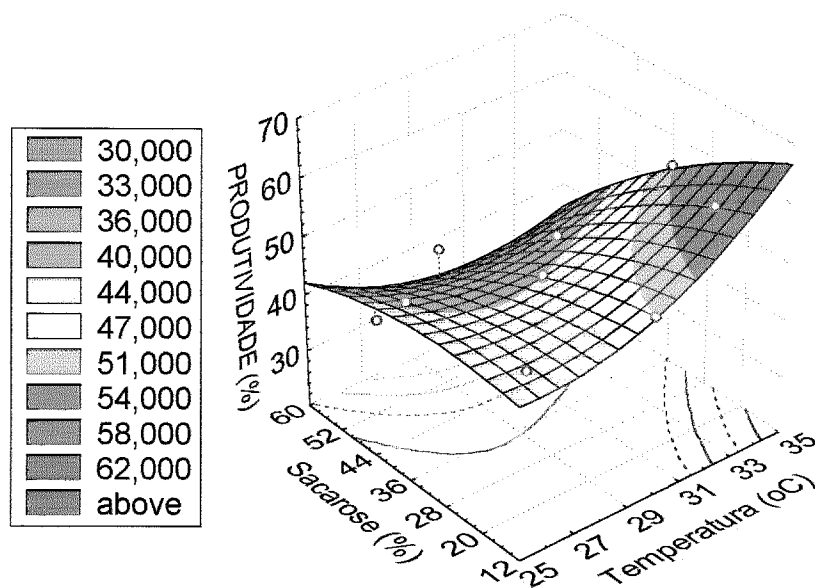
45 A - Cultivo do microrganismo: O microrganismo é inoculado em um meio de cultura constituído de 4% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 12% de melaço, ajustado para pH 6,5 em frascos de Erlenmeyer, e incubado a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por um período de 8 horas. A massa celular foi obtida por centrifugação durante 10 -15 minutos a 10.000rpm (11.000g) a 5°C.

B - Imobilização da massa celular: Uma suspensão de células contendo 20% (p/v) de células úmidas, foi misturada completamente, com uma de solução de alginato de sódio 1%, contendo 0,1% de tween 80 em uma proporção de volume de 1:2. A mistura foi homogeneizada com agitador magnético e, gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica em uma solução de cloreto de cálcio 2% para formar pequenas esferas de 3mm de diâmetro, as quais foram mantidas imersas na solução de cloreto de cálcio 2% por 24 horas a 5 -10°C. Antes de serem utilizadas, as esferas foram lavadas com água destilada, para a remoção do excesso de cloreto de cálcio. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.

C - Produção da isomaltulose: 40g de células imobilizadas foram colocadas em uma coluna encamisada (20cm de comprimento x 2,5cm de diâmetro). Nesta coluna foi injetada soluções de sacarose com concentrações variando de 12,5 a 60%, no sentido ascendente (contra fluxo) num fluxo de 21,88mL/hora. A temperatura da coluna variou entre 25 e 35°C e a conversão de sacarose para isomaltulose foi acompanhada durante 24 horas. As análises dos carboidratos foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (ionização de íons), utilizando-se um cromatógrafo líquido (Dionex), contendo uma coluna carbo Pac PA1(250 x 4 mm). A fase móvel era composta de hidróxido de sódio 150mM, degaseificado com hélio. A separação foi efetuada, utilizando-se a fase móvel num fluxo de 1ml/minuto. Nas condições experimentais utilizadas constatou-se que na faixa de 20 a 30% de sacarose, a produtividade de isomaltulose situa-se em torno de 50% de conversão, sendo levemente influenciada pelo aumento da temperatura (Figura 1a e 1b produtividade de isomaltulose em função da concentração de sacarose versus temperatura). Verificou-se também que concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40%), afeta a atividade da célula imobilizada devido ao efeito inibitório. Em experimento em fatorial completo, utilizando-se concentrações de 20 a 30% de sacarose e temperaturas de 35 a 40°C verificou-se que a temperatura não teve efeito na produtividade da isomaltulose, mas houve um efeito significativo da concentração da sacarose, ou seja, quanto maior a quantidade de sacarose, maior a produtividade da isomaltulose (Figura 2 produtividade de isomaltulose em função da concentração de sacarose). O aumento da produtividade de isomaltulose em função da concentração da sacarose, não foi na mesma proporção para cada acréscimo na quantidade de sacarose, ocorrendo uma maior variação em concentração maiores de sacarose. O excesso de concentração de sacarose possui poder inibitório sobre a célula imobilizada, mas pode aumentar a estabilidade da mesma (UK Patent Application GB 2063268 A , 1981). Portanto, o aumento na estabilidade da célula imobilizada com o aumento da concentração da sacarose, compensa a diminuição da atividade, uma vez que a produtividade da coluna aumenta. Alta concentração de sacarose, tende a inibir a divisão celular, previne a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

D - Purificação e Cristalização da isomaltulose: O eluente obtido da coluna, foi coletado e submetido a uma filtração em terra diatomácea. Após a filtração, o eluente foi homogeneizado a 30°C e submetido a cromatografia de troca iônica, em uma coluna de 30cm de comprimento e 4cm de diâmetro, contendo 310 mL de resina aniônica MSA1 (Dowex). Posteriormente, a amostra recolhida, foi submetida a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna

contendo 310 mL de resina catiônica 88 Dowex. Para finalizar o processo de retirada de íons e ácidos, o xarope foi eluído em uma coluna mista contendo as duas resinas acima citadas. Após a deionização o xarope obtido, foi submetido a um processo de concentração, num rotavapor RE120, sendo evaporado a cerca de 60 – 70°B a 52,7°C. Posteriormente, realizou-se um perfil de cristalização, variando-se lentamente a temperatura de 40 a 10°C. Para a realização do perfil, o xarope foi colocado em um banho-maria, com a temperatura inicial de 40°C e, submetido a uma constante agitação. O banho-maria foi programado para abaixar 5°C /hora entre 40 e 35°C e 2°C/hora entre 35 e 25°C e finalmente 3°C/hora entre 25 e 10°C, finalizando-se assim a cristalização. Os cristais foram coletados por centrifugação contínua a 3300rpm por 10 minutos, e borrifados com água gelada. A secagem foi efetuada a 80°C em estufa à vácuo por 1 hora. Os cristais obtidos possuíam 91,39% de isomaltulose.



$$Y = 196.679686 - 13.071999X + 1.942440Z + 0.270200X^2 - 0.064095XZ - 0.006354Z^2$$

(X= Temperatura; Z= Sacarose e Y= Produtividade de palatinose)

FIG 1A

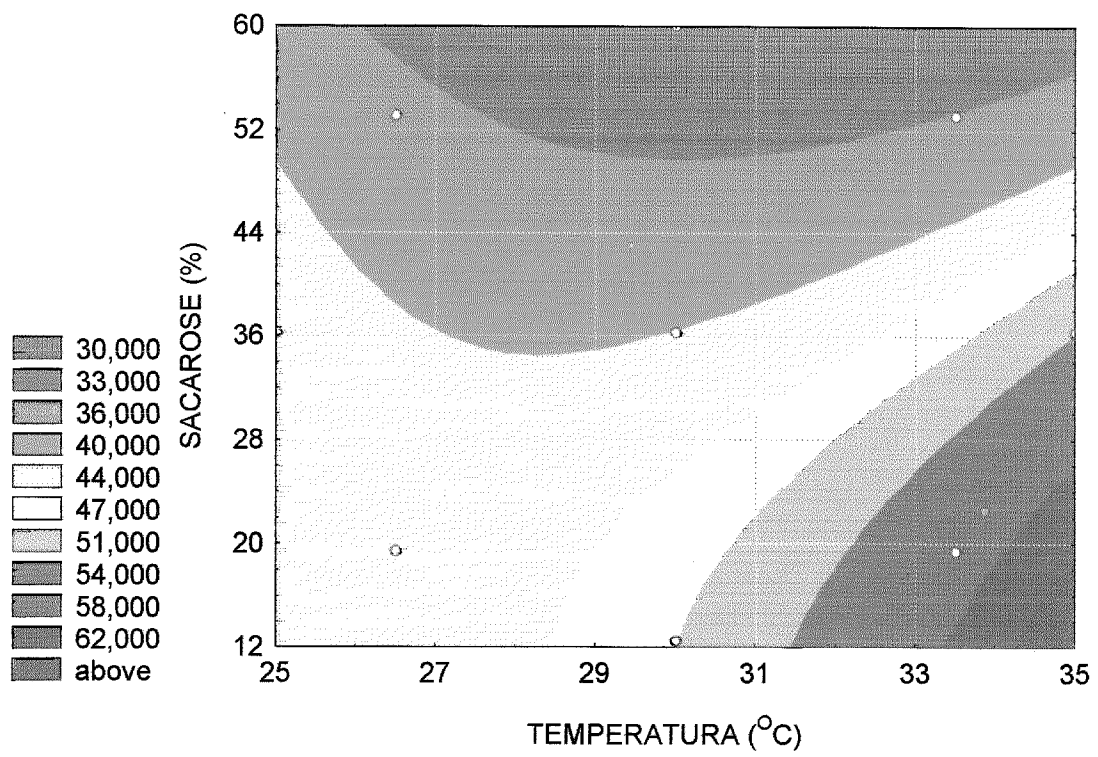


FIG 1B

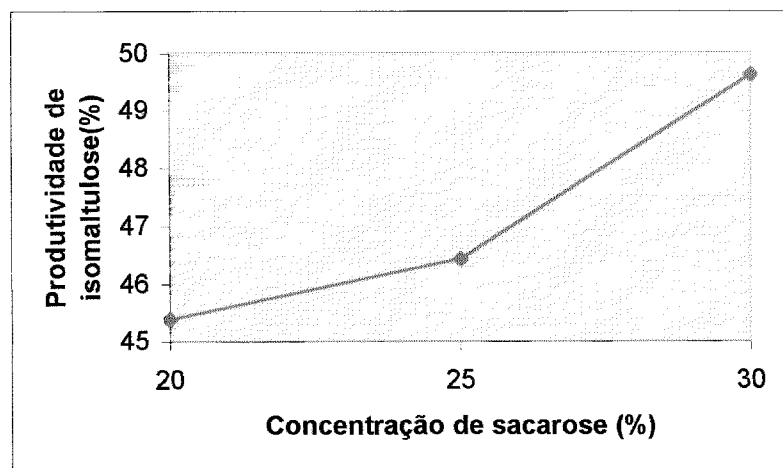


FIG. 2

REIVINDICAÇÕES

- 5 1-“PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO”, caracterizado por otimizar a produção de glicosiltransferase, através do cultivo de *Erwinia sp* D12 em meio de cultura contendo 10-20% de melaço, mais especificamente de 10-15% de melaço, 2-10% de peptona, mais especificamente de 2- 6% e 0,4-06% de extrato de carne.
- 10 2-“PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO”, caracterizado por utilizar o microrganismo *Erwinia sp* D12 imobilizado em alginato de sódio 1– 5 % e cloreto de cálcio de 2-4% com concentrações de células 10 – 40%, mais especificamente de 20 – 30%.
- 15 3-“PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO”, caracterizado por produzir enzimaticamente a isomaltulose, através da passagem de soluções de sacarose de 10 – 60% em uma coluna encamisada, com um fluxo de 0,01-0,3 do volume vazio da coluna por hora em temperaturas de 20 – 40°C, mais especificamente de 25 – 35°C, contendo células de *Erwinia sp* D12 imobilizadas. O tamanho da coluna pode ser escolhido como desejado. Como por exemplo 2,5cm de diâmetro por 20cm de comprimento.
- 20 4-“PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO”, caracterizado por purificar o eluente obtido da transformação enzimática da sacarose em isomaltulose, utilizando-se resinas aniônica, catiônica e mista e cristalização da isomaltulose por concentração do eluente entre 60-70°B, abaixamento de temperatura e
- 25 30 centrifugação.

RESUMO

- 5 “PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO” É um processo de produção de isomaltulose ou palatinose, através da conversão de sacarose em isomaltulose, pela enzima glicosiltransferase de células de *Erwinia sp* D12 imobilizadas. O processo consiste das seguintes etapas: cultivo do microrganismo em condições otimizadas; imobilização da massa celular obtida; transformação enzimática da sacarose em isomaltulose e, purificação e cristalização da isomaltulose.